J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 18, 1980, pp. 117–122

Radioimmunologische Bestimmungsmethoden für Dehydroepiandrosteron und 5-Androsten-3 β , 17 β -diol¹⁾

Von P. Benes, B. Morsches und H. Holzmann

Universitäts-Hautklinik, Mainz

(Eingegangen am 2. Mai/31. August 1979)

Herrn Prof. Dr. G. W. Korting zum 60. Geburtstag verehrungsvoll gewidmet

Zusammenfassung: Eine radioimmunologische Methode zur Bestimmung von Dehydroepiandrosteron und 5-Androsten-3 β , 17 β -diol im Plasma wird beschrieben. Störende Kreuzreaktionen des Antiserums für 5-Androsten-3 β , 17 β -diol mit Testosteron und Pregnenolon machen vor der Bestimmung eine dünnschichtchromatographische Auftrennung der Steroide notwendig. Diese Methode ist den bisher üblichen photometrischen und gaschromatographischen Verfahren hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit eindeutig überlegen. Die Nachweisgrenzen liegen für beide Steroide bei 170 fmol.

Radioimmunoassay of dehydroepiandrosterone and 5-androsten-3 β , 17 β -diol

Summary: A radioimmunological method is described for the determination of dehydroepiandrosterone and 5-androsten-3 β , 17 β -diol in plasma. Interfering cross-reactions of the antiserum of 5-androsten-3 β , 17 β -diol with testosterone and pregnenolone make it necessary to separate the steroids by thin-layer chromatography before their final determination. With respect to sensitivity, this method is superior to the commonly used photometric and gas-chromatographic analytical procedures. For both steroids the limits of detection are about 170 fmol.

Einführung

Dehydroepiandrosteron ist im menschlichen Plasma das quantitativ am stärksten vertretene Steroid. Seine Synthese erfolgt im wesentlichen in der Nebennierenrinde unter dem Einfluß von Corticotropin sowie in den Gonaden (1). Es liegt im menschlichen Organismus überwiegend als Sulfatkonjugat vor, während sich der Anteil an freiem Dehydroepiandrosteron bzw. Dehydroepiandrosteron-glucuronid auf höchstens 1,0 bzw. 0,5 % beläuft (2). Die physiologische Bedeutung des Dehydroepiandrosterons liegt in seiner Funktion als Vorstufe der Androgene und Östrogene (1) sowie in seiner spezifischen Hemmwirkung auf die Glucose-6-phosphat-dehydrogenase und der dadurch bedingten Regulation des Pentosephosphatcyclus in der Zelle (3–6). Ihm kommt damit ein bedeutsamer Einfluß auf Wachstums- und Proliferationsvorgänge zu (7).

Unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen konnten bereits Veränderungen im Dehydroepiandrosteron-Gehalt des Plasmas nachgewiesen

werden, so z.B. eine Erniedrigung bei Frauen in der Menopause und bei Männern mit zunehmendem Alter sowie bei Kranken mit Hyperlipidämie, Psychosen und Psoriasis (8,9). Auch über verminderte Dehydroepiandrosteron-Konzentrationen im Tumorgewebe wird berichtet (10).

Bei der Psoriasis finden sich Veränderungen im Dehydroepiandrosteron-Stoffwechsel, die möglicherweise genetisch fixiert sind und denen offenbar eine wesentliche Bedeutung innerhalb der Ätiopathogenese dieser Krankheit zukommen könnte (11). Sie sind durch eine vermehrte intrazelluläre Reduktion von Dehydroepiandrosteron zu 5-Androsten-3 β , 17 β -diol (12) sowie durch eine verminderte Penetration von Dehydroepiandrosteron durch die Zellmembran gekennzeichnet (13) und führen zu einem intra- und extrazellulär nachweisbaren Dehydroepiandrosteron-Mangel sowie zu einer erhöhten Konzentration an 5-Androsten-3 β , 17 β -diol (14, 15, 16).

Bei den von uns bisher durchgeführten Untersuchungen des Dehydroepiandrosteron-Stoffwechsels an Psoriatikern erfolgte die quantitative Bestimmung von Dehydroepiandrosteron mittels Dinitrophenylhydrazin (17) und die des 5-Androsten-3 β , 17 β -diol mittels der Oertel-Eik-Nes-

¹⁾ Mit freundlicher Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Reaktion (18). Beide Methoden weisen eine Nachweisgrenze von etwa 3 nmol Steroid auf. Damit waren die Bestimmungen von Dehydroepiandrosteron und 5-Androsten-3 β , 17 β -diol im Plasma ohne weiteres möglich (14,15). Schwierigkeiten ergeben sich allerdings bei entsprechenden Untersuchungen am Erythrocyten bzw. an der Haut, da die dort zu erwartenden intrazellulären Steroidkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze liegen. In den bisher durchgeführten Untersuchungen erfolgte daher die Bestimmung der entsprechenden Konzentrationen in Erythrocyten auf indirektem Wege nach der Inkubation der Zellen bzw. des Hämolsats mit Tritium-markiertem Dehydroepiandrosteron und Messung der in der Dehydroepiandrosteron bzw. 5-Androsten-3 β , 17 β -diol-Fraktion befindlichen Aktivität (13).

Da bekanntlich radioimmunologische Verfahren Nachweisgrenzen aufweisen, die im pmol-Bereich liegen, sollten die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit dazu dienen, sowohl für Dehydroepiandrosteron als auch für 5-Androsten-3 β , 17 β -diol einen Radioimmunoassay zu entwickeln, der es erlauben würde, diese Steroide auch in so geringen Konzentrationen zu erfassen, wie sie intrazellulär, also z.B. in Erythrocyten und Zellen der Haut, vorliegen.

Material und Methode

Steroide

Die radioetikierten Steroide [$7-^3\text{H}$ (N)] Dehydroepiandrosteron, spezifische Radioaktivität $888 \text{ GBq} \times \text{nmol}^{-1}$, [$7-^3\text{H}$ (N)]-Dehydroepiandrosteron-sulfat, spezifische Radioaktivität $925 \text{ GBq} \times \text{nmol}^{-1}$, [$7-^3\text{H}$ (N)] 5-Androsten-3 β , 17 β -diol, spezifische Radioaktivität $740 \text{ GBq} \times \text{nmol}^{-1}$ wurden von NEN Chemicals GmbH (D-6072 Dreieichenhain) bezogen. Die radiochemische Reinheit von Dehydroepiandrosteron und 5-Androsten-3 β , 17 β -diol wurde im aufsteigenden System Chloroform-Dioxan (Volumina, 94 ml + 6 ml), die von Dehydroepiandrosteron-sulfat im System Chloroform-Methanol-Ammoniak (Volumina, 15 ml + 5 ml + 0,2 ml) auf Kieselgel G (Merck, D-6100 Darmstadt) geprüft. Sie lag für Dehydroepiandrosteron bei 98,59 %, für Dehydroepiandrosteron-sulfat bei 98,05 %, für 5-Androsten-3 β , 17 β -diol bei 98,31 %. Die unmarkierten Steroide Dehydroepiandrosteron, Dehydroepiandrosteron-sulfat, 5-Androsten-3 β , 17 β -diol wurden von der Firma Merck (D-6100 Darmstadt) bezogen, andere verwendete Steroide von der Firma Steroloids Inc. (USA).

Lösungen

Für die radioimmunologischen Bestimmungen wurden folgende Reagenzien verwendet:

Boratlösung: 0,05 mol/l, pH 8,0

Lysozym-Puffer: Boratlösung mit Lysozym (1 g/l)

Ethylenglykollösung: 32,2 mmol/l

Kohle-Dextran-Suspension: 1 Volumen Kohle-Suspension (5 g Norit A, Serva Heidelberg, in 80 ml Boratlösung mit 6 g/l Beriglobin, Behringwerke Marburg) und 6 Volumina Dextran-Lösung (100 mg Dextran T-70, Pharmacia, Uppsala, gelöst in 80 ml Boratlösung mit 6 g/l Beriglobin)

[^3H] Dehydroepiandrosteron: $12 \times 10^6 \text{ Bq}$ in 1,0 ml Boratlösung [^3H] 5-Androsten-3 β , 17 β -diol: $12 \times 10^6 \text{ Bq}$ in 1,0 ml Boratlösung Standardlösungen: $1,7 \cdot 10^{-1} \text{ pmol}$, $3,4 \cdot 10^{-1} \text{ pmol}$, $6,9 \cdot 10^{-1} \text{ pmol}$, $1,7 \text{ pmol}$, $3,4 \text{ pmol}$, $6,9 \text{ pmol}$, $13,8 \text{ pmol}$ (Dehydroepiandrosteron), $17,2 \text{ pmol}$ (5-Androsten-3 β , 17 β -diol) Dehydroepiandrosteron bzw. 5-Androsten-3 β , 17 β -diol in 0,1 ml Ethylenglykollösung (32,2 mmol/l).

Herstellung des Antigens

Zur Herstellung des Haptens wurde Dehydroepiandrosteron mit O- (Carboxymethyl)-hydroxylamin und 5-Androsten-3 β , 17 β -diol mit Succinimid inkubiert. Die Kopplung der beiden Haptene an Rinderserumalbumin erfolgte mittels der Carbodiimid-Reaktion (19,20). Beide Produkte wurden anschließend durch Ausfällung mit Aceton und Dialyse bei pH 4,5 gereinigt und lyophilisiert. Die Bestimmung des Proteingehaltes im lyophilisierten Material erfolgte nach Lowry (21) mit Rinderserumalbumin als Standard. Der Sättigungskoeffizient wurde mit der Dansylchlorid-Methode bzw. durch Messung der substituierten NH_2 -Reste mittels UV-Absorption bei 254 nm bestimmt und lag für Dehydroepiandrosteron bei 24 und für 5-Androsten-3 β , 17 β -diol bei 22 Steroidmolekülen/Molekül Rinderserumalbumin.

Immunisierung²⁾

1 mg des Immunogens (5-Androsten-3 β , 17 β -diol-3 β -Hemisuccinat-Rinderserumalbumin) wurde in 0,5 ml NaCl-Lösung (9 g/l) suspendiert und mit 0,5 ml Freund'schem Adjuvans versetzt. Diese Emulsion wurde in die Hinterbeine von 5 Kaninchen injiziert. In den folgenden Monaten wurden Booster-Injektionen bei zwischenzeitlichen Antikörpertiterkontrollen durchgeführt. Nach 11 Monaten konnten bei 3 Kaninchen folgende Titer gemessen werden: 1:18.000, 1:10.500 und 1:4.000. Die Tiere wurden getötet, das Blut entnommen und das Serum in 10 ml-Portionen aufgeteilt. Während der nächsten 8 Monate führte die Lagerung des Serums bei -15°C zu keinem Verlust der Immunaktivität. Entsprechende Versuche zur Immunisierung von Kaninchen mit Dehydroepiandrosteron-Oxim-Rinderserumalbumin ergaben, trotz wiederholten Booster-Injektionen über insgesamt 12 Monate, keine verwertbaren Seruntiter. Für die weiteren Untersuchungen mit Dehydroepiandrosteron wurde daher auf das inzwischen vom Institut Pasteur (Paris, Frankreich) angebotene Antiserum zurückgegriffen.

Vorbereitung der Plasmaproben

0,2 ml Plasma wurden mit 0,8 ml NaCl-Lösung (9 g/l) verdünnt und durch Zugabe von 5 ml Aceton enteiweißt. Anschließend wurden die denaturierten Proteine abfiltriert und das Lösungsmittel eingedampft. Zum Trockenrückstand wurden 4 ml Acetatlösung (1 mol/l) pH 4,5 sowie 0,12 ml β -Glucuronidase/Arylsulfatase (Boehringer, D-6800 Mannheim) zugegeben. Eine vollständige Spaltung zeigte sich bei einer Inkubation des Substrats im Wasserbad bei 37°C über 48 h. Anschließend wurden die freien Steroide dreimal mit je 5 ml Ethylacetat extrahiert und der Extrakt zweimal mit je 5 ml NaOH (1 mol/l) und zweimal mit je 5 ml dest. Wasser gewaschen. Die neutralen Steroide, welche sich in der organischen Phase befanden, wurden mittels aufsteigender Platten-Chromatographie auf Kieselgel G (Merck, D-6100 Darmstadt) im System Chloroform-Dioxan (Volumina, 94 ml + 6 ml) aufgetrennt.

Die R_F -Werte für die getrennten Steroide sind in Tabelle 1 aufgeführt. Mögliche Verluste durch Extraktion und Chromatographie wurden mittels Zugabe von [^3H] Dehydroepiandrosteron bzw. [^3H] 5-Androsten-3 β , 17 β -diol ($2,0 \cdot 10^5 \text{ Bq}$) und anschließender Messung der "Recovery" berücksichtigt.

Zur Bestimmung der immunologischen Aktivität des 5-Androsten-3 β , 17 β -diol-Antiserums gegenüber den Steroiden, die zusammen mit 5-Androsten-3 β , 17 β -diol dünnschichtchromatographisch aufgetrennt werden, wurden dem Serum $4,0 \cdot 10^5 \text{ Bq}$ [$7-^3\text{H}$] 5-Androsten-3 β , 17 β -diol zugegeben. Nach der Chromatographie wurde die Kieselgelplatte in 1,5 cm breiten Streifen abgekratzt und jede einzelne Fraktion auf Radio- und Immunaktivität untersucht.

Radioimmunologische Bestimmung

Nach chromatographischer Auftrennung der einzelnen Steroide wird das Dehydroepiandrosteron bzw. 5-Androsten-3 β , 17 β -diol mit 10 ml Methylenchlorid aus der Platte eluiert und das Lösungsmittel im Wasserbad entfernt. Der Rückstand wird in 0,5 ml Lysozym-Puffer aufgenommen.

²⁾ Die Immunisierung erfolgte im Laboratorium von Prof. Dr. P. Vecsei (Pharmakologisches Institut, Heidelberg)

Tab. 1. Dünnschichtchromatographische Mobilität verschiedener Steroide auf Kieselgel G in unterschiedlichen chromatographischen Systemen (R_F -Werte).

Steroid	Relative Mobilität*)			
	1	2	3	4
Dehydroepiandrosteron	0,42	0,58	0,62	0,51
5-Androsten-3 β ,17 β -diol	0,24	0,40	0,50	0,24
5-Androsten-3 β ,16 α ,17 β -triol	0,09	0,29	0,35	0,07
3 β ,16 α -Dihydroxy-5-androsten-17-on	0,16	0,37	0,46	0,18
3 β ,17 β -Dihydroxy-5-androsten-16-on	0,17	0,37	0,45	0,18
4-Androsten-3,17-dion	0,64	0,71	0,64	0,69
Testosteron	0,31	0,54	0,58	0,57
3 α -Hydroxy-5 α -androstan-17-on	0,40	0,60	0,63	0,54
3 α -Hydroxy-5 β -androstan-17-on	0,37	0,64	0,61	0,43

*) 1 = System Ethylacetat-Cyclohexan (Volumina 10 ml + 1 ml)

2 = System Chloroform-Ethanol (Volumina 9 ml + 1 ml)

3 = System Ethylacetat-Cyclohexan-Ethanol (Volumina 9 ml + 9 ml + 2 ml)

4 = System Chloroform-Dioxan (Volumina 94 ml + 6 ml)

Zur weiteren radioimmunologischen Bestimmung, die in Anlehnung an die Methode von Abraham (22) erfolgt, werden zu 0,1 ml dieser Lysozypufferlösung (Plasmaproben) sowie zu 0,1 ml der jeweiligen Standardlösung 0,05 ml radioaktives Dehydroepiandrosteron bzw. 5-Androsten-3 β ,17 β -diol (etwa $6 \cdot 10^5$ Bq) in Boratpuffer sowie 0,5 ml Antiserum (Verdünnung in Lysozypuffer 1:10.500) gegeben. Nach dem Durchmischen werden die Proben im Eisbad bei 4 °C 90 Minuten inkubiert. Anschließend werden 0,1 ml Dextran-Kohle-Suspension zugegeben, die Proben gründlich gemischt und bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und die gebundene Radioaktivität nach Zugabe von 18 ml Szintillationsflüssigkeit (Unisolve I, Firma Zinsser, D-6000 Frankfurt) im β -Counter gemessen.

Ergebnisse und Diskussion

Die Standardkurve für Dehydroepiandrosteron zeigt bei lin-log Darstellung (s. Abb. 1), daß das Verhältnis zwischen dem Anteil an gebundenem [^3H]Dehydroepiandrosteron und der Dehydroepiandrosteron-Konzentration im Bereich von $1,7 \cdot 10^{-1}$ pmol bis 6,9 pmol eine approximativ lineare

Abb. 1. Standardkurve für Dehydroepiandrosteron.

Abb. 2. Standardkurve für 5-Androsten-3 β , 17 β -diol.

Funktion ist. Die entsprechende Standardkurve für [^3H] 5-Androsten-3 β ,17 β -diol (s. Abb. 2) zeigt ebenfalls eine approximativ lineare Funktion im Bereich zwischen $1,4 \cdot 10^{-1}$ pmol bis 5,1 pmol. Die Nachweisgrenze liegt sowohl für Dehydroepiandrosteron als auch für 5-Androsten-3 β , 17 β -diol bei $1,7 \cdot 10^{-1}$ pmol. Bei Verwendung eines Standardserums (34,6 nmol/l Steroid $\hat{=}$ 3,46 pmol/Ansatz) ergab sich innerhalb einer Analysenreihe (Intra-Assay) mit insgesamt 35 Werten eine relative Standardabweichung von 3,6 % für Dehydroepiandrosteron und 4,8 % für 5-Androsten-3 β ,17 β -diol. Zwischen den Analysenreihen (Inter-Assay) fand sich eine relative Standardabweichung von 7,2 % für Dehydroepiandrosteron und 7,9 % für 5-Androsten-3 β ,17 β -diol. Bei 25 Bestimmungen wurde zu den Plasmaproben $3,4 \cdot 10^{-1}$ pmol Dehydroepiandrosteron bzw. $3,4 \cdot 10^{-1}$ pmol 5-Androsten-3 β ,17 β -diol zugegeben. Das Verhältnis vom gefundenen zu dem zu erwartenden Wert lag für Dehydroepiandrosteron bei $95,1 \% \pm 10,3 \%$, für 5-Androsten-3 β ,17 β -diol bei $94,8 \% \pm 11,7 \%$.

Diese radioimmunologischen Bestimmungsmethoden von Dehydroepiandrosteron und 5-Androsten-3 β ,17 β -diol sind den bisher verwendeten photometrischen und gaschromatographischen Verfahren hinsichtlich Empfindlichkeit und Genauigkeit eindeutig überlegen (s. Tab. 2). Damit ergibt sich die Möglichkeit einer relativ einfachen Bestimmung dieser Steroide auch in solchen biologischen Materialien, in denen sie nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen, wie z.B. intrazellulär in Erythrocyten oder in Hautextrakten.

Im Blutplasma ergibt sich wegen der relativ hohen Konzentration die Möglichkeit, mit weniger Untersuchungsmaterial auszukommen. So reichen für die Bestimmung von freiem Dehydroepiandrosteron bzw. freiem 5-Androsten-3 β ,17 β -diol bereits 1–2 ml und für die Bestimmung des Gesamt-Dehydroepiandrosterons bzw. Gesamt-5-Androsten-3 β ,17 β -diols bereits 0,2 ml aus.

Da bei der radioimmunologischen Bestimmung von Dehydroepiandrosteron und 5-Androsten-3 β ,17 β -diol

Tab. 2. Empfindlichkeit verschiedener Methoden zur Bestimmung von Dehydroepiandrosteron und 5-Androsten-3 β , 17 β -diol
1) freies Steroid 2) Gesamt-Steroid.

Steroid	Methode	Nachweisgrenze	benötigte Plasmamenge
Dehydroepiandrosteron	Photometrie	1,73 nmol	100 ml ¹⁾ 10 ml ²⁾
	Gaschromatographie	$3,47 \cdot 10^{-2}$ nmol	20 ml ¹⁾ 2 ml ²⁾
	Radioimmunoassay	$1,73 \cdot 10^{-4}$ nmol	1 ml ¹⁾ 0.2 ml ²⁾
5-Androsten-3 β , 17 β -diol	Photometrie	3,44 nmol	200 ml ¹⁾ 20 ml ²⁾
	Gaschromatographie	$3,44 \cdot 10^{-2}$ nmol	20 ml ¹⁾ 2 ml ²⁾
	Radioimmunoassay	$1,72 \cdot 10^{-4}$ nmol	2 ml ¹⁾ 0.2 ml ²⁾

Tab. 3. Kreuzreaktionen von Dehydroepiandrosteron-Antiserum.

	Kreuzreaktion in %
Dehydroepiandrosteron	100
4-Androsten-3,17-dion	1,6
Dehydroepiandrosteron-sulfat	0,5
5-Androsten-3 β , 17 β -diol	0,5
Testosteron	0,5
Pregnenolon	0,1
5 α -Androstan-3,17-dion	0,1
5-Androsten-3 β , 16 α , 17 β -triol	0,05
3 β , 17 β -Dihydroxy-5-androsten-16-on	0,05
3 β , 16 α -Dihydroxy-5-androsten-17-on	0,04
Östradiol	0,03
Progesteron	0,03
5-Pregnen-3 β , 20 α -diol	0,02
Cortison, Corticosteron, Aldosteron	0,001

zugrundeliegenden Antigen-Antikörper-Reaktion nur die freien Steroide an den Antikörper gebunden werden, muß zur Erfassung der gesamten Steroidkonzentration eine Spaltung der 3 β - Δ 5-Steroidkonjugate erfolgen. Nach den Untersuchungen von Roy (23) und Ludwig et al. (24) kann diese enzymatisch mit Arylsulfatase durchgeführt werden. Eigene Untersuchungen mit Tritium-markiertem Dehydroepiandrosteron-sulfat ergaben, daß nach der Spaltung mit Arylsulfatase $90,8 \pm 7,1$ % des eingesetzten Steroidsulfats als freies Steroid vorlag. Weitere Verluste traten bei der Extraktion der Steroide aus dem Plasma sowie bei der anschließenden chromatographischen Auftrennung auf. Entsprechende Untersuchungen mit [7-³H]Dehydroepiandrosteron-sulfat führten zu einer Wiederfindungsrate von $63,3 \pm 11,2$ %. Es empfiehlt sich daher, bei der radioimmunologischen Bestimmung von Dehydroepiandrosteron und 5-Androsten-3 β , 17 β -diol die Wiederfindungsrate durch Zusatz von markiertem Steroid zu erfassen und die Verluste rechnerisch zu eliminieren.

Die Spezifität der Antiseren für Dehydroepiandrosteron und 5-Androsten-3 β , 17 β -diol ist durch das Ausmaß der Kreuzreaktion des entsprechenden Antiserums mit verschiedenen Haptene definiert. Es wurden natürliche C₁₈, C₁₉ und C₂₁-Steroide auf Kreuzreaktionen geprüft und die Ergebnisse in Tabelle 3 und Tabelle 4 dargestellt. Es zeigt sich, daß die Kreuzreaktionen für das Dehydroepiandrosteron-Antiserum für alle untersuchten Steroide sehr niedrig sind. Hinsichtlich der Spezifität des 5-Androsten-3 β , 17 β -diol-Antiserums fällt auf, daß Testosteron eine höhere Kreuzreaktion aufweist, als 5-Androsten-3 β , 17 β -diol selbst. Dies kann damit erklärt werden, daß als Hapten das 3 β -Hemisuccinat des 5-Androsten-3 β , 17 β -diol benutzt wurde und so die 17 β -Hydroxygruppe nicht blockiert war. Bei der 5-Androsten-3 β , 17 β -diol-Bestimmung ist daher eine dünnschichtchromatographi-

Tab. 4. Kreuzreaktionen von 5-Androsten-3 β , 17 β -diol-Antiserum.

	Kreuzreaktion in %
5-Androsten-3 β , 17 β -diol	100
Testosteron	181
17 β -Hydroxy-5 β -androstan-3-on	45,7
5 α -Androstan-3,17-dion	41,8
4-Androsten-3,17-dion	11,2
Östradiol	4,9
Dehydroepiandrosteron	3,9
3 β , 17 β -Dihydroxy-5-androsten-16-on	1,5
5-Androsten-3 β , 16 α , 17 β -triol	0,24
Progesteron	0,07
Pregnenolon	0,02
5-Pregnen-3 β , 20 α -diol	0,02

sche Abtrennung des Testosterons erforderlich. Die Messung der immunologischen Aktivität des 5-Androsten-3 β , 17 β -diol (s. Abb. 3) ergab, daß die hohe Konzentration für Testosteron mittels der Dünnschichtchromatographie sehr gut zu eliminieren ist.

Im Blutplasma ist damit eine isolierte Bestimmung von Dehydroepiandrosteron ohne vorherige dünnschichtchromatographische Abtrennung der übrigen Steroide möglich. Dagegen ist bei der Bestimmung von 5-Androsten-3 β , 17 β -diol wegen der Kreuzreaktionen des entsprechenden Antiserums eine dünnschichtchromatographische Isolierung des Steroids erforderlich.

Die Ergebnisse (Tab. 5) der radioimmunologischen Bestimmung von Dehydroepiandrosteron und 5-Androsten-

Tab. 5. Mit verschiedenen Methoden erhaltene Normalwerte ($\mu\text{mol/l}$) für Dehydroepiandrosteron und 5-Androsten-3 β , 17 β -diol im Plasma.

	Eigene Ergebnisse			Literatur (14, 15, 25–28)	
	Radio-immunoassay	Gaschromatographie	Photometrie	Gaschromatographie	Photometrie
	$\delta + \varphi$ n=16	$\delta + \varphi$ n=4	$\delta + \varphi$ n=4	$\delta + \varphi$ n=137	$\delta + \varphi$
Dehydroepiandrosteron	2,34 (16) $\pm 0,42$	2,53 (4) $\pm 1,2$	3,1 (4) $\pm 1,7$	2,49 $\pm 1,3$	3,02 $\pm 0,98$
5-Androsten-3 β , 17 β -diol	0,40 (16) $\pm 0,10$	0,37 (4) $\pm 0,20$	0,31 (4) $\pm 0,28$	---	0,26 $\pm 0,09$

Abb. 3. Immunogramm nach der Chromatographie auf Kieselgel im System Chloroform-Dioxan (Volumina, 94 ml + 6 ml)

— Immunoaktivität von 5-Androsten-3 β , 17 β -diol-Antiserum.
 - - - Radioaktivität von [γ - ^3H]5-Androsten-3 β , 17 β -diol.

3 β , 17 β -diol im Plasma stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten, welche mittels Gaschromatographie bzw. Photometrie erhalten wurden, weitgehend überein (14, 15, 25–28). Der Vorteil der hier beschriebenen radioimmunologischen Methoden liegt vor allem in der hohen Empfindlichkeit. Damit ist die Möglichkeit gegeben, kleinste Mengen von Blutplasma zu verarbeiten und weiterhin die Konzentration von Dehydroepiandrosteron und 5-Androsten-3 β , 17 β -diol auch in solchen biologischen Materialien zu bestimmen (Erythrocyten, Haut), in denen das mit anderen Methoden wegen der sehr niedrigen Konzentration der entsprechenden Steroide außerordentlich schwierig ist.

Literaturverzeichnis

- Schulster, D., Burstein, S. & Cooke, B. A. (1976), *Molecular Endocrinology of the Steroid Hormones*. John Wiley and Sons, London–New York–Sydney–Toronto.
- Baillieu, E. E., Corpechot, C., Dray, F., Emiliozzi, R., Lebeau, M. C., Mauvais-Jarvis, P. & Robel, P. (1965), *Recent Progress in Hormone Research* 21, 411–494.
- Benes, P., Freund, R., Menzel, P., Starka, L. & Oertel, G. W. (1970), *J. Steroid Biochem.* 1, 287–290.
- Marks, P. A. & Banks, J. (1960), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 46, 447–452.
- Oertel, G. W. & Rebelein, I. (1969), *Biochim. Biophys. Acta* 184, 459–460.
- Levy, R. H. (1962), *J. Biol. Chem.* 238, 775–784.
- Holzmann, H., Fränz, J., Morsches, B., Oertel, G. W. & Degenhardt, K.-H. (1973), *Arzneim.-Forsch.* 23, 271–274.
- Oertel, G. W., Benes, P., Schirazi, M., Holzmann, H. & Hoffmann, G. (1974), *Experientia* 30, 872–873.
- Lopez, J. & Krehl, W. (1967), *Lancet* II, 485–487.
- Oertel, G. W., Benes, P., Hoffmann, G. & Schuy, E. (1975), *Experientia* 31, 1124.
- Holzmann, H., Benes, P. & Morsches, B. (1980), *Der Hautarzt im Druck*.
- Morsches, B., Hoffmann-Trefz, G., Hoffmann, G., Oertel, G. W. & Holzmann, H. (1974), *Arch. Dermatol. Forsch.* 250, 269–275.
- Hoffmann, G., Morsches, B., Döhler, U., Holzmann, H. & Oertel, G. W. (1972), *Arch. Dermatol. Forsch.* 243, 18–30.
- Holzmann, H., Krapp, R., Morsches, B., Hoffmann, G. & Oertel, G. W. (1971), *Ärzt. Forsch.* 25, 345–353.
- Holzmann, H., Morsches, B., Krapp, R., Hoffmann, G. & Oertel, G. W. (1972), *Z. Haut-Geschl. Krkh.* 47, 99–110.
- Morsches, B., Holzmann, H., Oertel, G. W. & Bregenzner, M. (1971), *Arch. Dermatol. Forsch.* 240, 204–211.
- Treiber, L. & Oertel, G. W. (1967), *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 5, 83–86.
- Oertel, G. W. & Eik Nes, K. B. (1959), *Anal. Chem.* 31, 98–101.
- Erlanger, B. F., Borek, F., Beiser, S. M. & Liebermann, S. (1959), *J. Biol. Chem.* 234, 1090–1094.
- Erlanger, B. F., Borek, F., Beiser, S. M. & Liebermann, S. (1959), *J. Biol. Chem.* 228, 713–727.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951), *J. Biol. Chem.* 193, 226–231.
- Abraham, G. E. (1969), *J. Clin. Endocrinol.* 29, 866–872.

23. Roy, A. B. (1970), Enzymological Aspects of Steroid Conjugation. In: Chemical and Biological Aspects of Steroid Conjugation (Bernstein, S. & Solomon, S. eds.) Springer Verlag Berlin.
24. Ludwig, R., Spitteller, G., Matthaei, D. & Scheleer, F. (1978), J. Chrom. 146, 381–391.
25. Kumari, G. L., Collins, W. P. & Sommerville, I. F. (1969), J. Chrom. 41, 22–36.
26. Wang, D. Y., Bulbrook, R. B., Herian, M. & Hayward, J. Zl. (1974), European J. Cancer 10, 477–482.
27. Migeon, C. J. (1972), Amer. J. Med. 53, 606–626.
28. Roberts, K. D. & Liebermann, S. (1970), The Biochemistry of the 3 β -Hydroxy- Δ^5 -Steroid Sulfates. In: Chemical and Biological Aspects of Steroid Conjugation (Bernstein, S. & Solomon, S. eds.) Springer Verlag Berlin.

Dipl. Chem. Dr. rer. nat. P. Benes
Dipl. Chem. Prof. Dr. rer. nat. B. Morsches
Prof. Dr. med. H. Holzmann
Universitäts-Hautklinik
Langenbeckstraße 1
D-6500 Mainz